

**A peroxinitrit szerepe a késői prekondicionálással és  
posztkondicionálással kiváltott kardioprotekcióban**

**Pályázati téma összefoglalása**

**Kedvesné dr. Kupai Krisztina**

**Szegedi Tudományegyetem**

**2011**

## **Bevezető**

Magyarországon a hiperlipidémia és ateroszklerózis talaján kialakuló iszkémiás szívbetegség népbetegségnek tekinthető. Az ennek talaján kialakuló szívizom iszkémia majd ennek következményeként kialakuló súlyos ritmuszavarok, szívelégtelenség és szívinfarktus a vezető halálokok közé tartoznak. A koronária keringés helyreállítása, az életet veszélyeztető ritmuszavaroknak és a szívfunkció csökkenésének megakadályozása, illetve megelőzése elsőrendű feladatnak tekintendő.

## **A szív iszkémiás adaptációja**

Bár a reperfúzió nélkülözhetetlen az iszkémia által károsodott szívizom felépüléséhez, mégsem kockázatmentes, mivel maga a reperfúzió tovább súlyosbíthatja az iszkémiás károsodást. Ismert azonban a szívizom azon képessége, hogy alkalmazkodni képes az iszkémia/reperfúziós inzultushoz.

A szív endogén adaptációs mechanizmusai közé tartozik a pre- és poszt kondicionálás, amelyek megnövelik a szív és más szövetek tűrőképességét egy hosszabb iszkémiával szemben. Iszkémiás prekondicionálásban rövid iszkémiás epizódokat az iszkémia előtt, míg poszt kondicionálásban közvetlenül az iszkémiát követő reperfúzió elején alkalmazunk. A prekondicionálás és poszt kondicionálás hatására az iszkémia/reperfúziót követően számottevően csökken az infarktus mérete és az aritmiák előfordulása, valamint javul a szívfunkció. A prekondicionálás protektív hatása két fázisban nyilvánul meg: a "klasszikus" prekondicionálás az iszkémiás stressz után percekkel jelentkezik, s mintegy három óráig tart. A "késői" prekondicionálás védőhatásának kialakulását a lassúbb kezdet jellemzi, és 72 órán át figyelhető meg. Számos egyéb mediátor mellett a nitrogén-monoxid (NO), reaktív oxigén származékok, mint a peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>), és antioxidáns enzimek szerepét feltételezik pre- és poszt kondicionálás kialakulásában. A ONOO<sup>-</sup> egy erőteljes oxidáns, amely *in vivo* körülmények között keletkezhet a NO és a szuperoxid-anion nem-enzimatis, diffúzió limitált reakciójának következtében. Mára már széles körben elfogadottá vált a megnövekedett ONOO<sup>-</sup> képződés oxidatív és nitrozatív stresszt okozó szerepe számos kardiovaszkuláris és egyéb patológiás állapotban. Azonban az is ismert, hogy az endogén ONOO<sup>-</sup> termelődés stressz-válaszreakciókat aktiválhat és triggerként szerepelhet a patkány szívizom stressz adaptációjában.

Tanulmányunk során a szívizom iszkémiás adaptációs képességeinek celluláris mechanizmusait vizsgáltuk állatkísérletekben, különös tekintettel a NO, a szuperoxid és a ONOO<sup>-</sup>, valamint ennek egyik celluláris targetjének, a matrix-metalloproteináz-2-nek (MMP-2) a szerepére.

Számos szisztémás betegség (pl. hiperlipidémia, hipertónia, diabétesz) szintén kapcsolatba hozható a koszorúér-betegség kockázatának növekedésével. Ismert, hogy a prekondicionálás kardioprotektív hatása elvész hiperlipidémiában. A posztkondicionálásról viszont kevés ismeret áll rendelkezésre. Ezért munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a posztkondicionálással létrehozható kardioprotekció kiváltható-e hiperlipidémiás állatmodellben.

## **Célkitűzés**

### Tanulmány 1.

A késői prekondicionálás hatásmechanizmusának vizsgálata *in vivo*. Munkánk során a NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> és ONOO<sup>-</sup> változásokra és ONOO<sup>-</sup>-MMP-2 útvonalra fókuszáltunk.

### Tanulmány 2.

A posztkondicionálás protektív hatásának vizsgálata hiperlipidémiában. Vizsgáltuk továbbá a ONOO<sup>-</sup> szerepét a posztkondicionálás hatásmechanizmusában.

## **Módszerek**

### Tanulmány 1.

Hím Wistar patkányok szívét *in vivo* prekondicionáltuk 5 egymást követő ciklusban 4 perc iszkémia/4 perc reperfüzió váltakozó ismétlésével, melyet 24 óra elteltével 30 perces iszkémia és 2 óra reperfüzió követett. A reperfüzió végén az infarktusos terület nagyságát határoztuk meg trifenil-tetrazolium (TTC) festéssel.

A prekondicionálást követő 0, 3, 6, 12 vagy 24 óra elteltével a szívekből mintát vettünk, és meghatároztuk a szöveti NO szintet elektron spin rezonanciával és a NO szintáz (NOS) izoenzimek aktivitását [<sup>14</sup>C]arginin-[<sup>14</sup>C]citrullin esszével. A szívek szuperoxid anion tartalmát dihidroetidium festést követően fluoreszcens mikroszkóppal határoztuk meg, a xantin-oxidoreduktáz és NADPH-oxidáz aktivitását fluorometriás kinetikus esszével és kemilumineszcens módszerek segítségével detektáltuk, a szuperoxid diszmutáz (SOD) aktivitást spekrofotometriásan határoztuk meg. A ONOO<sup>-</sup> marker molekuláját, a 3-nitrotirozint ELISA-val mértük. Mivel a ONOO<sup>-</sup> aktiválni képes az MMP enzimeket, ezért

zimográfia segítségével meghatároztuk az MMP-2 ill. MMP-9 enzimek aktivitását a miokardiumból. Ezen kívül QRT-PCR segítségével megvizsgáltuk a NOS, MMP enzimek és endogén inhibitoraik, a szöveti proteáz gátló (TIMP) fehérjék génexpressziós változását.

Annak eldöntésére, hogy kimutatható-e ok-okozati összefüggés MMP enzimek gátlása és az infarktusos terület nagysága között, MMP inhibitor Ilomastatot (1,5  $\mu$ mol/kg) *iv.* adtunk a regionális iszkémia előtt 5 perccel, az iszkémia 10. és 25. percében és a reperfüzió 10. percében *in vivo*, majd az infarktus terület nagyságát detektáltuk TTC festéssel.

### Tanulmány 2.

Hím Wistar patkányokat normál illetve 2% koleszterinnel dúsított táppal etettük *ad libitum* a hiperlipidémia kifejlődése érdekében 12 héten keresztül. A diéta végén a szíveket izoláltuk és 30 perc regionális iszkémiának majd 120 perc reperfüziónak tettük ki *ex vivo*. A reperfüzió végén az infarktusos területet TTC festéssel határoztuk meg. A poszt kondicionálást az iszkémiát követően váltottuk ki a reperfüzió szakaszos megindításával (6-szor illetve 12-szer ismételt 10 s-os reperfüziót követő 10 s-os iszkémia). Külön kísérletsorozatban normolipidémiás és hiperlipidémiás szíveket 30 perc regionális iszkémiának és 5 perc reperfüziónak tettük ki. A poszt kondicionálást 6x10 másodperces ciklussal váltottuk ki. A szövetekből 3-nitrotirozin szintet határoztunk meg western blottal és ELISával. A ONOO<sup>-</sup> pontos szerepének teszteléséhez a poszt kondicionálás ideje alatt és az iszkémia utolsó 20 másodpercében a ONOO<sup>-</sup> elbomlását katalizáló FeTPPS-sel (20mg/l) kezeltük a szíveket, majd a 120 perces reperfüzió elteltével infarktus területet határoztunk meg TTC festéssel.

## **Eredmények**

### Tanulmány 1

A késői prekondicionálás szignifikánsan csökkentette az infarktusos terület nagyságát az áloperát csoporthoz képest. A NO szintéziséért felelős enzimek közül az iNOS aktivitása változott szignifikánsan a prekondicionálást követő 12 és 24 órában a 0 órás időponthoz képest, és az áloperált csoporthoz képest is. Mindezek ellenére a szöveti NO szintek nem változtak szignifikánsan. A XOR és NADPH-oxidáz enzimek időben emelkedést mutattak mindkét csoportban, szignifikáns eltérést 24 óra elteltével tapasztaltunk a 0 órás időpillanathoz képest. A szív szuperoxid tartalma szignifikánsan nőtt a késői prekondicionálás során, míg a SOD enzimek aktivációja szignifikánsan lecsökkent a prekondicionálást követő 24 órával a 0 órás időpillanathoz képest, valamint csökkenés mutatkozott az áloperált csoporthoz képest is. A szuperoxidból és NO-ból képződő 3-nitrotirozin a prekondicionálás

során lecsökkent a 24 órás mintákban. QRT-PCR analízist követően a prekondicionálás szignifikánsan fokozta a szívben az nNOS és MMP-9 mRNS szintet, az MMP-2 és TIMP3 mRNS mennyisége pedig csökkent. A kardiális MMP-2 és MMP-9 enzimaktivitásokban szintén csökkenést tapasztaltunk zimográfiával a prekondicionálást követően 24 órával. Az infarktusos terület nagysága és az MMP-k aktivációja közötti ok-okozati összefüggés tesztelésére a nem-szelektív MMP inhibitor Ilomastatot alkalmaztunk. Inhibitor jelenlétében infarktusos terület csökkenést tudtunk szignifikánsan elérni az áloperált csoporthoz képest.

### Tanulmány 2

Eredményeink szerint a poszt kondicionálás 6x10 másodperces ciklusokkal normolipidémiás szívekben csökkentette az infarktusos terület nagyságát és a kamrai fibrillációk gyakoriságát *ex vivo*. Ez a kardioprotekció nem volt megfigyelhető hiperlipidémiás állatokban. Egy potensebb, 12x10 másodperces ciklusokkal létrehozott poszt kondicionálás sem volt képes csökkenteni az infarktusos terület nagyságát hiperlipidémiában, valamint a normolipidémiás szívekben sem bizonyult hatékonynak. A reperfüzió 5. percében mind a szabad, mind pedig a fehérjékhez kötött 3-nitrotirozin mennyisége megemelkedett szignifikánsan a normolipidémiás szívekben poszt kondicionálást követően, de ez a hatás nem volt megfigyelhető hiperlipidémiában. A ONOO<sup>-</sup> szerepének megértéséhez a ONOO<sup>-</sup> elbomlását katalizáló FeTPPS-t adtunk a perfúziós oldatba a poszt kondicionálás alatt, melynek során azt tapasztaltuk, hogy FeTPPS jelenlétében a poszt kondicionálás nem volt képes csökkenteni az infarktusos terület nagyságát.

### **Konklúzió**

A késői prekondicionálás javította a szívizom reperfüziós károsodását *in vivo*, azáltal, hogy csökkentette a szív 3-nitrotirozin mennyiségét és az MMP-k aktivitását. A késői prekondicionálás során megnövekedett az iNOS aktivitása, ellenben a NO szint nem mutatott szignifikáns változást. A SOD aktivitásban csökkenést tapasztaltunk, melynek következménye a fokozott szuperoxid mennyiség a szívben. Méréseink arra engednek következtetni, hogy a fokozott szuperoxid szintért a megnövekedett iNOS lehet a felelős. Ebben a modellben tanulmányoztuk a ONOO<sup>-</sup>-MMP szignál traszdukciós utat a szívben, melynek során bebizonyosodott, hogy az MMP-k gátlók alkalmazásával fokozható a szívizom iszkémiás adaptációja iszkémia/reperfüzióval szemben.

A poszt kondicionálás mérsékli a reperfüziós károsodást, de hiperlipidémiás szívekben a poszt kondicionálás infarktus területet csökkentő hatása elvész. Állatmodellünkben

rámutattunk a posztkondicionálás során alkalmazott ciklusszámok fontosságára. Kimutattuk, hogy az alacsony mértékű ONOO<sup>-</sup> képződés a stressz adaptáció kiváltásában igen fontos trigger szerepet tölt be. Valószínűsíthető, hogy a protekció elvesztése hiperlipidémiában a nitrozatív trigger hiányára vezethető vissza.

A pre- és posztkondicionálás védőhatásában szerepet játszó celluláris mechanizmusok feltérképezése egy új, a pre- és posztkondicionálás biokémiai folyamatain alapuló gyógyszeres kezelés kifejlesztését segíthetik, valamint fontos szerepet játszhatnak a szív iszkémiás adaptációs képességének megőrzésében, illetve fokozásában, s ezáltal az iszkémiás szívbetegségből eredő halálozások csökkentésében.